

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002-522070

(P2002-522070A)

(43)公表日 平成14年7月23日(2002.7.23)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
C 1 2 N 5/10		A 6 1 K 35/30	2 G 0 4 5
A 6 1 K 35/30		A 6 1 P 25/16	4 B 0 2 4
A 6 1 P 25/16		C 1 2 Q 1/04	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/04		1/68	A 4 B 0 6 5
1/68		G 0 1 N 33/15	Z 4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 33 頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2000-565106(P2000-565106)	(71)出願人	シグナル ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121, サン ディエゴ, オバーリン ドライ ブ 5555
(86) (22)出願日	平成11年8月12日(1999.8.12)	(72)発明者	サー, ダイナー, ダブリュー, アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア 州, ラ ホヤ, クリフリッジ アベニュー 8492
(85)翻訳文提出日	平成13年2月13日(2001.2.13)	(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名)
(86)国際出願番号	P C T / U S 9 9 / 1 8 4 0 3		
(87)国際公開番号	W O 0 0 / 0 9 6 6 9		
(87)国際公開日	平成12年2月24日(2000.2.24)		
(31)優先権主張番号	0 9 / 1 3 4 , 7 7 1		
(32)優先日	平成10年8月12日(1998.8.12)		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
(81)指定国	E P (A T, B E, C H, C Y, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), A U, C A, J P		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 ヒト中脳細胞系およびその使用方法

(57)【要約】

条件付きで不死化されたヒト中脳細胞系を提供する。前記細胞系は、クローンであってもよいが、ドーパミン作動性ニューロンをはじめとするニューロンを形成させるのに使用することができる。該細胞系および／または分化した細胞は、パーキンソン病のような各種の神経学的疾患を予防および治療するための治療薬の開発に用いられる。さらに、該細胞系および／または分化した細胞はアッセイにおいて使用したり、中脳細胞の発生と分化の一般的研究に使用することもできる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞の生産方法であって、

(a) 増殖を可能とする第1の表面上で第1の増殖培地中にプレートされたヒト中脳細胞を、選択マーカーをコードするDNAと外部的に調節可能な増殖促進遺伝子によりトランスフェクトし、

(b) 該トランスフェクト細胞を、付着および増殖を可能とする第2の表面上で第2の増殖培地中にて選択し、そこから条件付きで不死化されたヒト中脳細胞を取得する、

ことを含んでなる上記方法。

【請求項2】 第1および第2の表面が、ポリアミノ酸、フィブロネクチン、ラミニンまたは組織培養プラスチックのうちの1種以上を含む基体からなる群より独立に選択される、請求項1記載の方法。

【請求項3】 増殖促進遺伝子が癌遺伝子である、請求項1記載の方法。

【請求項4】 癌遺伝子がv-mycである、請求項3記載の方法。

【請求項5】 増殖促進遺伝子の発現がテトラサイクリンにより阻止される、請求項1記載の方法。

【請求項6】 ニューロンへと分化することが可能な、条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞。

【請求項7】 ドーパミン作動性ニューロンへと分化することが可能な、請求項6記載の条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞。

【請求項8】 GABA作動性ニューロンへと分化することが可能な、請求項6記載の条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞。

【請求項9】 増殖促進遺伝子の発現を阻止する条件下で請求項1に従って生産された細胞を培養することを含んでなる、ニューロンの生産方法。

【請求項10】 前記細胞をテトラサイクリン含有培地中で培養する、請求項9記載の方法。

【請求項11】 前記細胞を1種以上の分化因子の存在下で培養する、請求項9記載の方法。

【請求項12】 分化因子がフォルスコリン、GDNF、CTNF、IGF-IおよびBDNFからなる群より選択される、請求項11記載の方法。

【請求項13】 請求項9記載の方法により生産されたニューロン。

【請求項14】 請求項9記載の方法により生産されたドーパミン作動性ニューロン。

【請求項15】 請求項9記載の方法により生産されたGABA作動性ニューロン。

【請求項16】 哺乳動物に、請求項1または請求項9記載の方法により生産された細胞を投与することを含んでなる、哺乳動物へのヒト中脳細胞の移植方法。

【請求項17】 患者に、請求項1または請求項9記載の方法により生産された細胞を投与することを含んでなる、該患者のパーキンソン病の治療方法。

【請求項18】 ヒト中脳細胞により産生されたタンパク質の活性をモジュレートする薬剤についてスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1または請求項9記載の方法により生産された細胞に候補薬剤を接触させ、

(b) 続いて、該細胞により産生されたタンパク質の活性をモジュレートする候補薬剤の能力を測定する、
ことを含んでなる上記方法。

【請求項19】 サンプル中のタンパク質の存在または不在を検出する方法であって、

(a) 請求項1または請求項9記載の方法により生産された細胞にサンプルを接触させ、

(b) 続いて、該細胞における応答を検出し、そこからサンプル中のタンパク質の存在を検出する、
ことを含んでなる上記方法。

【請求項20】 請求項1または請求項9記載の方法により生産された細胞の培養物内の遺伝子またはタンパク質の存在を検出することを含んでなる、ヒト中脳遺伝子またはタンパク質の同定方法。

【請求項21】 ヒト中脳細胞の死に影響を及ぼす薬剤についてスクリーニングする方法であって、

- (a) 請求項1または請求項9記載の方法により生産された細胞に候補薬剤を、候補薬剤の不在下では該細胞の死をもたらす条件下で接触させ、
- (b) 続いて、該細胞の死に影響を及ぼす候補薬剤の能力を測定する、ことを含んでなる上記方法。

【請求項22】 ヒト中脳細胞の死を調節するタンパク質についてスクリーニングする方法であって、

- (a) 請求項1または請求項9記載の方法により生産された細胞内のタンパク質の発現レベルを改変させ、
- (b) 続いて、該改変が該細胞の死に及ぼす作用を測定し、そこからヒト中脳神経前駆細胞の死を調節するタンパク質を同定する、ことを含んでなる上記方法。

【請求項23】 請求項1記載の方法に従って生産される、条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞。

【請求項24】 クローン細胞系内に存在する、請求項23記載の細胞。

【発明の詳細な説明】**【0001】**技術分野

本発明は一般的にはヒト中脳細胞系に関するものである。さらに特定すると、本発明は、ドーパミン作動性ニューロンへと分化することが可能な、条件付きで不死化された中脳細胞系および該細胞系由来の分化した細胞に関する。このような細胞系および／または分化細胞は治療薬の開発に、あるいはパーキンソン病などの疾病の治療に使用することができる。本発明はまた、種々のアッセイにおいて、または中脳の発生と分化の研究のために前記細胞系および／または分化細胞を使用することに関する。

【0002】発明の背景

哺乳動物の脳において、ドーパミン系は運動調節、ホルモン分泌調節、情動調節にとって極めて重要である。ドーパミン作動性神経伝達の変化が様々な神経系の障害に関与している。そのような障害の一つがパーキンソン病であり、この疾病は線条体内のドーパミンの欠損が原因である。現在、この疾病を治療または予防するための適切な方法は皆無である。L-DOPAがパーキンソン病の患者に投与されてきたが、そのような治療は一般に有効でないと考えられている。

【0003】

胎児の神経組織（例えば、ドーパミン作動性ニューロンを含む中脳組織）の移植片は、ヒトおよびモデル動物においてパーキンソン症候群の症状を改善することが示された。しかし、そのような移植片の使用は、十分な量の移植用組織を入手することが困難であることもあって、制限を受ける。さらに、そのような組織は凍結保存が十分には功を奏さず、新鮮な組織の移植が必要である。一般的には、組織を（例えば、ウイルス汚染物を確認するために）評価する期間が必要であるので、新鮮な組織の使用は好ましくない。

【0004】

したがって、当分野では、パーキンソン病の研究や薬物創製のためのヒト中脳ドーパミン作動性ニューロンの補充可能な供給源として使用することができる、

容易に分化可能で安定した中脳細胞系を必要としている。本発明はこうした要求を満たし、その他の関係した有益性を提供するものである。

【0005】

発明の概要

簡単に述べると、本発明は、ニューロンへと分化することが可能な、条件付きで不死化されたヒト中脳細胞系を提供する。一態様において、本発明は、条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞の生産方法を提供する。該方法は、(a) 増殖を可能とする第1の表面上で第1の増殖培地中にプレートされたヒト中脳細胞を、選択マーカーをコードするDNAと外部的に調節可能な増殖促進遺伝子によりトランスフェクトし、(b) 該トランスフェクト細胞を、付着および増殖を可能とする第2の表面上で第2の増殖培地中にて選択し、そこから条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞を取得する、ことを含んでなる。特定の実施形態において、第1および第2の表面は、ポリアミノ酸（例えば、ポリリシンまたはポリオルニチン）、フィブロネクチン、ラミニンまたは組織培養プラスチックのうちの1種以上を含む基体からなる群より独立に選択される。増殖促進遺伝子はv-mycなどの癌遺伝子である。増殖促進遺伝子の発現は、必要というわけではないが、テトラサイクリンで阻止することができる。

【0006】

他の態様において、本発明は、ドーパミン作動性ニューロンへと分化することが可能な、条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞、およびGABA作動性ニューロンへと分化することが可能な、条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞を提供する。

【0007】

本発明はさらに、増殖促進遺伝子の発現を阻止する条件下で上記の条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞を培養することを含んでなる、ニューロンの生産方法を提供する。特定の実施形態において、前記細胞はテトラサイクリン含有培地中で、かつ／または1種以上の分化因子（例えば、フォルスコリン、GDNF、CTNF、IGF-Iおよび／またはBDNF）の存在下で培養される。

【0008】

さらなる態様において、本発明は、上記のようにして生産されたニューロンを提供する。

【0009】

本発明はさらに、他の態様において、上記のようにして生産された細胞を哺乳動物に投与することを含んでなる、哺乳動物へのヒト中脳細胞の移植方法を提供する。

【0010】

さらなる態様においては、上記のようにして生産された細胞を患者に投与することを含んでなる、該患者のパーキンソン病の治療方法を提供する。

【0011】

他の態様においては、ヒト中脳細胞により産生されたタンパク質の活性をモジュレートする薬剤についてスクリーニングする方法が提供される。該方法は、(a) 上記のようにして生産された細胞に候補薬剤を接触させ、(b) 続いて、該細胞により産生されたタンパク質の活性をモジュレートする候補薬剤の能力を測定する、ことを含んでなる。

【0012】

さらなる態様において、本発明は、サンプル中のタンパク質の存在または不在を検出する方法を提供する。該方法は、(a) 上記のようにして生産された細胞にサンプルを接触させ、(b) 続いて、該細胞における応答を検出し、そこからサンプル中のタンパク質の存在を検出する、ことを含んでなる。

【0013】

本発明はさらに、上記のようにして生産された細胞の培養物内の遺伝子またはタンパク質の存在を検出することを含んでなる、ヒト中脳遺伝子またはタンパク質の同定方法を提供する。

【0014】

さらなる態様においては、ヒト中脳細胞の死に影響を及ぼす薬剤についてスクリーニングする方法が提供される。該方法は、(a) 上記のようにして生産された細胞に候補薬剤を、候補薬剤の不在下では該細胞の死をもたらす条件下で接触させ、(b) 続いて、該細胞の死に影響を及ぼす候補薬剤の能力を測定する、ことを

含んでなる。

【0015】

本発明はさらに、ヒト中脳細胞の死を調節するタンパク質についてスクリーニングする方法を提供する。該方法は、(a) 上記のようにして生産された細胞内のタンパク質の発現レベルを改変させ、(b) 続いて、該改変が該細胞の死に及ぼす影響を測定し、そこからヒト中脳神経前駆細胞の死を調節するタンパク質を同定する、ことを含んでなる。

【0016】

他の態様において、本発明は、上記のようにして生産された、条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞を提供する。かかる細胞はクローン細胞系内に存在しうる。

【0017】

本発明の上記および他の態様は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照することで明らかとなろう。本明細書中に引用した全ての文献は、それぞれが個別に組み込まれているかのように、参照によりその全体をここに含めるものとする。

【0018】

詳細な説明

上述のとおり、本発明は、一般的には、条件付きで不死化されたヒト中脳細胞系、その細胞系から分化した細胞、およびそのような細胞を用いる各種の方法に関する。特に、本発明は、ドーパミン作動性ニューロンへと分化可能な条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞、および医薬品の発見および開発、移植研究、治療法および種々のアッセイのためのそのような細胞の使用に関する。本発明の条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞系はクローン細胞系とすることができ、そうでなくともよい。本明細書に記載の細胞系は、均一な細胞の永続的で再生可能な供給をもたらす、パーキンソン病などの疾患の治療および医薬品開発を促すものである。

【0019】

条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞は、一般的にはヒト中脳組織(

例えば、胎児中脳組織)から調製される。そのような組織は、好ましくは標準的な方法を用いて分離する。次いでその組織を洗い、増殖させることのできる表面上および増殖培地中(すなわち、少なくとも24時間を経て約1%の細胞が2倍となることのできる表面および培地)にプレートする。好ましい増殖培地の1つは、DME M/F-12、10%仔ウシ血清、およびFGF-2(ヒト遺伝子組換え体、40ng/mL、Boehringer Mannheim, Indianapolis, 米国インディアナ州)を含有する。適切な表面としては、限定はされないが、ポリアミノ酸の1種または組み合わせ(例えば、ポリリジンおよび/またはポリオルニチン)、組織培養プラスチックおよびラミニンもしくはフィブロネクチンで処理した表面を挙げることができる。細胞は通常は $10^3 \sim 10^5$ 個/cm² の範囲の密度、好ましくは約 3×10^4 個/cm² の密度でプレートしうる。

【0020】

ヒト中脳神経前駆細胞は、増殖促進遺伝子(すなわち、適切な条件下でトランスフェクトされた細胞の増殖を促進するようなタンパク質をコードする遺伝子)を含んでいる任意の適切なベクターを用いて、プレートされた細胞を、その増殖促進タンパク質の産生および/または活性が外部因子によって調節可能となるようにトランスフェクトすることによって条件付きで不死化することができる。好ましい一実施形態においては、増殖促進遺伝子は癌遺伝子で、そのようなものとしては限定はされないが、v-mycが挙げられる。増殖促進遺伝子として用いることのできるその他の癌遺伝子としては、N-myc、c-myc、p53、SV40ラージT抗原、ポリオーマラージT抗原、アデノウイルスのE1a、およびヒトパピローマウイルスのE7タンパク質が挙げられる。通常は、「増殖促進遺伝子」は、本明細書に記載のtetで調節される発現系内で用いる場合には、ニューロンに分化することのできる神経前駆細胞の培養物を生じせしめる任意の遺伝子である。

【0021】

増殖促進タンパク質の外部的な調節は、増殖促進遺伝子を外部的に調節可能なプロモーター(すなわちその活性が、例えば、トランスフェクトされた細胞の温度、またはその細胞と接触する培地の組成を改変することによって調節することのできるプロモーター)の制御下に置くことによって行うことができる。通常は

、増殖促進遺伝子の発現の調節は比較的厳格なものとすべきである(すなわち、プロモーターが抑制されている場合には増殖促進遺伝子の発現は通常は本明細書に記載の免疫蛍光法では検出できないようにすべきである)。例えば、テトラサイクリン(tet)で制御される遺伝子発現系を用いることができる(Gossenら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551, 1992; Hoshimaruら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1518-1523, 1996)。tetのない状態では、このベクター内のtetで制御されるトランスアクチベーター(tTA)は、ヒトサイトメガロウイルス由来の最少プロモーターをtetオペレーター配列と融合させたものである ph_{CMV-1} からの転写を強く活性化する。tTAは大腸菌(E.coli)のトランスポゾン-10由来のtet耐性オペロンのレプレッサー(tetR)と単純ヘルペスウイルスのVP16の酸性ドメインとの融合タンパク質である。tetが低濃度、非毒性濃度($0.01 \sim 1.0 \mu\text{g/mL}$)である場合は、ほぼ完全にtTAによるトランス活性化がなくなる(すなわち、v-mycは本明細書記載の免疫蛍光アッセイを用いての検出ができなくなる)。

【0022】

好ましい一実施形態においては、該ベクターはさらに選択マーカー(例えば、薬剤耐性を付与するタンパク質)をコードする遺伝子を含む。細菌性のネオマイシン耐性遺伝子(neo^R)は、本発明の範囲内で用いることのできるそのようなマーカーの1つである。 neo^R を持っている細胞は、 $25 \sim 250 \mu\text{g/mL}$ のG418を増殖培地に添加するなどの当業者には公知の方法によって選択することができる。当業者であれば、その他のマーカーを用いることができ、適切な選択を容易に行うことができることは自明のことであろう。

【0023】

トランスフェクションは当業者に公知の種々の方法の任意のものによっても行うことができるが、そのようなものとして限定はされないが、レトロウイルス感染が挙げられる。通常は、プレートされた細胞は適切なレトロウイルス(例えば、VSV-G偽型LINC v-myc レトロウイルス、これは下記に詳述している)の感染によってトランスフェクトすることができる。ウイルスのより高いストック濃度を得るため、選択した培地中での(遠心後)ストックを得るため、およびヒト細胞への感染性を増大させるために、VSV-G偽型レトロウイルスを使用するのが好まし

い。最近開発された(伝統的なものではない)VSV-G偽型レトロウイルスベクターは、ヒト細胞への感染に特に有用であるが、それはVSV-糖タンパク質に対するレセプターは伝統的な両栄養性エンベロープタンパク質に対するレセプターよりも豊富に存在し、種特異性がより少ないためである。さらに、VSV-G偽型ウイルス粒子は超遠心分離に耐え、ウイルスの濃縮ができ神経前駆細胞の増殖と両立する増殖培地中に再懸濁できる(Burnsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037, 1993)。

【0024】

例えば、上記のとおり調製した中脳神経前駆細胞培養物は、プレートしてから5日以内に、約12~24時間(例えば、1晩)、ポリブレン(4~8 μ g/mL)の存在下でインキュベートすることによってレトロウイルスに感染させることができる。次いで、レトロウイルスを新鮮な増殖培地で洗うことによって除去することができる。選択マーカーを有しているトランスフェクトされた細胞は、通常は付着と増殖が可能な表面上および増殖培地中で選択することができる。ある表面の付着能は肉眼による顕微鏡検査で測定することができる。通常は、細胞の少なくとも約20%がその表面に付着するはずである。好ましい増殖培地の1つは、N2サプリメント(GIBCO, Baltimore, 米国メリーランド州)、ラットCNS前駆細胞からの馴らし培地(50%、Sahら, Nature Biotechnology 15:574-580, 1997によって述べられているとおり調製したもの)、FGF-2(ヒト遺伝子組換え体、40ng/mL、Boehringer Mannheim, Indianapolis, 米国インディアナ州)、EGF(ヒト遺伝子組換え体、40ng/mL、GIBCO, Baltimore, 米国メリーランド州)、およびPDGFA/B(ヒト遺伝子組換え体血小板由来増殖因子、20ng/mL、Boehringer Mannheim, Indianapolis, 米国インディアナ州)を含むDMEM/F-12である。適切な表面としては、限定はされないが、上述のポリアミノ酸の1種または組み合わせ(例えば、ポリリシンおよび/またはポリオルニチン)、組織培養プラスチックおよびラミニンもしくはフィブロネクチンで処理した表面を挙げることができ、付着性の単層として増殖させるべきである。

【0025】

トランスフェクション後、培養物は、例えば、N2サプリメント、FGF-2(40ng/m

L)、EGF(40ng/mL)、およびPDGFA/B(20ng/mL)を含むDMEM/F-12を含有する簡略化増殖培地中で維持することができる。コンフルエンスに近づいた培養物をトリプシン処理によって継代し、1:5に分割することができる。典型的には、ほぼコンフルエンスなT75フラスコ1個で 10^7 個の細胞を得ることができ、培養物は3~7日毎に継代させることができる。また、細胞は長期保存のために液体窒素中で凍結させうる。

【0026】

クローン細胞系は、上述のとおり調製した条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞系から単離することができる。通常は、そのようなクローン細胞系は標準的な技法、例えば限界希釈またはクローニングリングの使用によって単離して増やすことができる。クローン細胞系は通常は上述のように栄養補給して継代させうる。ゲノムサザンブロットをクローナリティの確認のために行うことができる。

【0027】

条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞系(クローンでもよいが、そうでなくともよい)は、通常は増殖促進遺伝子の発現を阻害することによって(すなわち、増殖促進タンパク質の産生および/または活性を抑制することによって)ニューロンへの分化を誘導することができる。例えば、増殖促進タンパク質をコードする遺伝子が外部的に調節可能なプロモーターの制御下に置かれている場合には、条件(例えば、培地の温度もしくは組成)をその増殖促進遺伝子の転写を抑制するように改変することができる。上述のテトラサイクリンによって制御される遺伝子発現系では、テトラサイクリンを添加して増殖促進遺伝子の転写を抑制することによって分化を起こさせることができる。通常は、 $1\sim 5\mu\text{g/mL}$ のテトラサイクリンで48時間処理することで神経の形態学的分化を開始させるには十分であり、その後数日間に分化したニューロンの数は増加する。そのような分化は例えば、細胞を、N2サプリメントおよびテトラサイクリン($1\sim 5\mu\text{g/mL}$)を加えたDMEM/F-12からなる培地中の適切な基体(例えば、ポリアミノ酸の1種または組み合わせ、フィブロネクチン、ラミニン、または組織培養プラスチック)に細胞をプレートすることによって行うことができる。本発明の範囲内では、分化がフォルス

コリン($10\mu\text{M}$)、GDNF(グリア細胞由来神経栄養因子; 20ng/mL)、CNTF(毛様体神経栄養因子; 20ng/mL)、IGF-I(インスリン様増殖因子; 100ng/mL)、およびBDNF(脳由来神経栄養因子; 20ng/mL)の添加によって増強されることが見出された。その後培地は一新することができる(2~4日毎に)。

【0028】

分化細胞にはドーパミン作動性神経細胞(すなわち、ドーパミンを発現する神経細胞)がある。そのような細胞は、ドーパミンの合成に関与する酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ(TH)の存在に基づいて同定することができる。通常は、標準的な免疫蛍光技法を用いて、検出可能なレベルのTHを発現している細胞はドーパミン作動性とみなされる。GABA作動性分化細胞も同様に免疫蛍光法でのGABAの検出に基づいて同定することができる。

【0029】

前駆細胞系と分化細胞系双方の特性評価は、通常は、当業者には周知の技法を用いて行うことができ、そのような方法としては、細胞型の形態学的分析、免疫細胞化学、およびPCR(細胞型特異的マーカーおよびレセプターの同定ならびに増殖促進遺伝子の存在を確認するために)、ならびに電位依存性およびリガンド依存性電流による電気生理学的分析が挙げられる。簡潔に述べれば、神経細胞は位相明細胞体(phase bright cell bodies)および長く細い突起の存在に基づいて形態学的に同定することができる。上記のとおり、神経のマーカーとしては、ドーパミン作動性ニューロンのマーカーであるTH、およびGABA作動性ニューロンのマーカーであるGABAが挙げられる。Map2abも、汎ニューロンマーカーとして用いることができる。そのようなマーカーの存在または不在は標準的な免疫蛍光技法で(例えば、市販の一次抗体および蛍光試薬を用いて)容易に測定することができ、またそのようなマーカーをコードするmRNAのレベルをPCRまたはハイブリダイゼーション技法を用いて測定することができる。細胞のファイヤアクションポテンシャル(fire action potential)およびナトリウム、カルシウム、およびカリウム電流ならびにリガンド依存性電流(例えば、ドーパミン(DA)、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)、カイニン酸(KA)、及び γ -アミノ-n-酪酸(GABA))を生ずる能力を評価するために当業者には公知の電気生理学的分析法を行って、機能を有す

るチャンネルおよびレセプターのレベルを測定することができる。

【0030】

ヒトの条件付きで不死化された中脳神経前駆細胞は通常はドーパミン産生ニューロンをin vitroまたはin vivoで産生させるために用いることができる。in vivoでの使用には、条件付きで不死化された中脳神経前駆細胞は、その細胞がin vivoで分化するように移植することができる。あるいはまた、in vitroで作製された分化したドーパミン作動性ニューロンを移植することができる。

【0031】

移植は通常は当業界で公知の適切な技法のいかなるものを用いても行うことができる。例えば、所望の位置への細胞の導入(例えば注射によって)が容易となるような送達用器具(注射筒など)中に細胞を投入することができる。細胞は通常は本明細書記載の移植のための医薬組成物中にある。

【0032】

細胞は通常は、パーキンソン病を治療する能力について、該疾病を有する種々のモデル動物の任意のものを用いて評価することができる。適切なラットモデルとしては、6-ヒドロキシドーパミン、1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン(MPTP)での処理、または黒質線条体路の外科的解離(たとえば、Bjorklundら, Nature 298:652-654, 1982を参照せよ)によって生じた黒質ドーパミン作動性細胞内の損傷を有するラットが挙げられる。アカゲザルモデルまたはヒツジモデルも用いることができ、そのモデルでは動物はMPTPの処理によって発生した黒質ドーパミン作動性細胞における損傷を有している(例えば、Smithら, Neuroscience 52:7-16, 1993; Bakayら, Appl. Neurophysiol. 48:358-361; Zamirら, Brain Res. 322:356-360, 1984; およびBaskinら, Life Sci. 54:471-479, 1994を参照せよ)。細胞は標準的な技法を用いて移植することができ、その移植片が周囲の組織に組み込まれたか否かを調べるために、形態学的および免疫組織化学的な検討を行うことができる。回転対称モデル(Freedら, Neural Transplants: Development and Function, Sladekら編, Plenum Press, NY, 373-406, 1984)などの行動試験を、機能を有する形で組み込まれているかを確認するために用いることができる。

【0033】

患者の治療用には、条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞系および/またはモジュレート剤(例えば、下記に示すとおり、ヒト中脳神経前駆細胞によって産生されるタンパク質の活性を阻害もしくは増強することのできるもの、または分化したヒト中脳神経前駆細胞の死を阻害できるもの)を患者に投与することができる(予防のためまたは現在の症状の治療のためのいずれか)。そのような細胞および/またはモジュレート剤を用いて予防および/または治療する症状としては、限定はされないが、パーキンソン病が挙げられる。特に、パーキンソン病の治療には、分化したドーパミン作動性神経細胞を、例えば患者の線条中へ移植することができる。通常は細胞を標準的な技法を用いて移植によって患者の体内に導入することができる。モジュレート剤は当業者には公知の種々の経路のいかなるものを経由させても投与することができる。そのような薬剤はその活性型で、プロドラッグとして(すなわち、患者の体内で活性型に変換される化合物)、またはそのモジュレート剤もしくはプロドラッグをコードする核酸配列として投与することができる。本発明のこの態様で用いるための条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞は、それらの細胞が1つ以上の追加のタンパク質(モジュレート剤など)を患者の体内で発現するようにさらにトランスフェクトすることができるが、必ずしもそうでなくともよい。

【0034】

患者への投与には、1種以上の条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞(および/またはモジュレート剤)は通常は医薬組成物に製剤化される。医薬組成物は滅菌水溶液または非水性溶液、懸濁液もしくはエマルジョンとすることができ、それはさらに生理学的に許容しうる担体(すなわち、有効成分の活性を妨害しない、無毒の物質)を含むことができる。当業者には既知のいかなる担体も適切なものであれば本発明の医薬組成物に用いることができる。担体の選択は、部分的には、投与される物質(すなわち細胞または化合物)の特性の如何による。代表的な担体としては、生理食塩液、ゼラチン、水、アルコール、天然もしくは合成油、ショ糖溶液、グリコール、オレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステル、またはそれらの物質の組み合わせが挙げられる。場合により、医薬組成物はさ

らに保存剤および/またはその他の添加剤、例えば抗微生物剤、抗酸化剤、キレート剤および/または不活性ガス、および/もしくはその他の有効成分を含有することができる。

【0035】

投与の経路と回数、ならびに投与量は患者毎に異なり、投与される物質の特性によっても異なる。一般的には、モジュレート剤を含む医薬組成物は、静脈内、筋肉内、皮下、または体腔内に投与することができる。連日投与とすることができる。細胞を含む組成物は通常は1回以上移植できる。適切な投与量とは、パーキンソン病などの神経学的症状に冒されている患者の症状の改善を示すのに十分な量か、またはそのような症状の発症を阻害するのに十分な量である。症状の改善は、その疾患に伴う臨床症状の改善および/または遅延に基づいて検出することができる。症状の改善は、投与後または移植後数週間または数ヶ月で起こりうるが、その期間内に必ずしも改善されるとは限らない。一般的には、1回投与量中に含まれるモジュレート剤の量、または1回投与量中に存在するDNAによって *in situ* で産生されるモジュレート剤の量は、宿主1kgあたり約1mgから約200mgの範囲である。1回投与量の適切な量は患者の身体の大きさによっても変わるが、典型的には10～60kgの動物に対して約0.1mLから約5mLの範囲である。

【0036】

本発明の特定の態様の範囲内では、条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞系は種々の *in vitro* アッセイおよびスクリーニングに用いることができる。本明細書に記載の細胞系が既知の多数のアッセイおよびスクリーニングに用いることができること、ならびにそれらの方法を行う上での特定のパラメーターおよび判定基準は行おうとするアッセイに依存することは明らかであろう。当業者であれば既知の方法および同定しようとする化合物の所望の性質に基づいて、特定の *in vitro* アッセイおよびスクリーニング法を容易にデザインすることができる。

【0037】

特定の *in vitro* アッセイ法においては、本明細書に記載の分化したまたは未分化の条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞系は、その細胞中の対象の核酸分子またはタンパク質の存在または不在を検出するために用いることができる。それら

の細胞内の特定の核酸配列(すなわち、DNAおよび/またはRNA)を検出するためには、PCRおよび/または種々のハイブリダイゼーション技法などの既知の方法を用いることができる。そのようなアッセイ法は、例えばSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, 米国ニューヨーク州, 1989中に記載の方法を用いて容易にデザインし行うことができる。タンパク質を検出するためには、検出試薬は典型的には抗体で、下記に示すように調製することができる。サンプル中のタンパク質の検出に抗体を用いるための種々のアッセイフォーマットが当業者に知られている。例えば、HarlowおよびLane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照せよ。そのようなアッセイ法で用いるための抗体はポリクローナルであってもモノクローナルであってもよい。抗体は当業者には既知の種々の技法のいずれを用いても調製することができ、対象のタンパク質に対して特異的なモノクローナル抗体は、例えば、KohlerおよびMilstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976、およびその改良法を用いて調製することができる。あるいはまた、タンパク質は、当業界で既知の適切なアッセイ法のいかなるものを用いても、そのタンパク質の活性に基づいて検出することができる。

【0038】

そのようなアッセイは通常は、例えば、ある薬剤のヒト中脳神経前駆細胞またはニューロンによって産生されるタンパク質の活性をモジュレートする活性を評価する方法で用いることができる。そのようなアッセイでは、分化したまたは未分化の細胞を、候補薬剤がタンパク質の活性をモジュレートするために十分な条件下および時間、その薬剤と接触させることができる。接触後、細胞によって産生されるタンパク質の活性を候補薬剤がモジュレートする能力は、標準的な技法、例えばPCRまたはハイブリダイゼーション(mRNAのレベルを評価するために)、または対象のタンパク質の測定に適切な種々のイムノアッセイまたは機能アッセイのいずれかなどを用いて測定することができる。例えば、カルシウム感受性または電位感受性色素共役アッセイ(voltage-sensitive dye coupled assay)、cAMP測定および/または受容体結合アッセイを候補モジュレート剤の効力を評価するために行うことができる。一般的には、そのようなスクリーニングに用いるた

めの抗体またはその他の薬剤の適切な量はその特定のタンパク質によって変わるが、約 $10\mu\text{g}$ から約 100mg の範囲となる。

【0039】

本明細書で用いている「モジュレーション」という用語は、対象のタンパク質の活性の抑制または増強を含むものである。そのようなモジュレーションは転写または翻訳の段階で生ずるか、またはインタクトなタンパク質の活性を改変した結果であり得る。タンパク質の活性のモジュレーションは直接的(すなわち、そのモジュレート剤が対象のタンパク質と直接的に相互作用する)なもの、または間接的(すなわち、そのモジュレート剤が1つ以上の他のタンパク質の発現および/または活性を変え、それが次いで対象のタンパク質の活性をモジュレートする)であり得る。モジュレート剤は抗体(例えばモノクローナル)、ポリヌクレオチド、またはその他の薬剤とすることができる。細胞性タンパク質のいずれかの活性をモジュレートするような薬剤をこのスクリーニングで同定することができる。特定の実施形態においては、モジュレート剤は、神経伝達物質の受容体(例えば、DA受容体、AMPA-選択性受容体、カイニン酸受容体、GABA受容体、アデノシン受容体、および/または5-HT受容体)、増殖因子受容体(例えば、FGF-2、EGF、BDNF、NGF、CNTF、NT-3 および/またはGDNFに対する受容体)、またはイオンチャネル(例えば、ナトリウムチャネル、カルシウムチャネル、および/またはカリウムチャネル)などのタンパク質に対するものを同定することができる。好ましいモジュレート剤はタンパク質の活性を少なくとも $1/2$ に抑制するか、または2倍に増強することができる。

【0040】

本発明の別の態様においては、本明細書記載の細胞系は、天然の神経前駆体または神経細胞性環境でのタンパク質および/または遺伝子の発現を調べるシステム内で用いることができる。例えば、当業者にはよく知られた方法を用いて受容体の発現および/または活性をアッセイすることができ、そのような発現および/または活性への種々の改変の影響を評価することができる。そのような方法の1つでは、細胞系は永続性または一過性で1種以上の対象の遺伝子でトランスフェクトすることができ、その対象の遺伝子とは、限定はされないが、膜タンパク

質、分泌タンパク質、または細胞内タンパク質などを産生もしくは改変する遺伝子がある。そのような遺伝子としては、イオンチャネル、神経伝達物質の受容体、神経変性疾患の家族性のタイプの変異を受けているタンパク質(例えば、シヌクレイン(synuclein))および/またはMAPキナーゼが挙げられる。また、トランスフェクトされた遺伝子は薬剤開発に用いるためにリポーター遺伝子と結合させてもよい。本明細書に記載のこの態様およびその他の態様では、条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞は、分化させることなく用いることができ、または分化した細胞を用いることもできる。さらに、継代数の異なる細胞、および種々の条件のいずれで増殖させた細胞も用いることができる。本発明の細胞系は既存の細胞系に比べ、そのような研究のための多数の利点を有しており、その利点としては、ニューロンを産生しうるクローン化した細胞系を提供しうること、および条件付きで不死化された特性を有していることが挙げられ、その条件付きで不死化によって特別なステージで発生を止めることができる。何らかの所与の研究のための特定の細胞の選択はその研究の目的に依存し、当業者であれば本明細書に記載の技法を用いて適切な細胞を容易に調製し得る。

【0041】

さらなる態様では、本発明の条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞系はサンプル中の特定のタンパク質の存在または不在を検出するためのアッセイに用いることができる。一般的には、アッセイはそのような細胞をサンプルと接触させ、次いで当業者には知られている方法を用いてその細胞内のタンパク質によって誘導される応答を測定することにより行う。例えば、応答は示差表示(differential display)技法を用いて測定することができる。

【0042】

さらなる態様においては、本明細書に記載の条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞系は、増殖性で分化した(例えば、ドーパミン作動性神経性)ヒト中脳神経前駆細胞中に存在する新規の遺伝子およびタンパク質の同定に用いることができる。PCR、示差表示、ハイブリダイゼーション、発現ライブラリーのスクリーニング、免疫アッセイ、および2ハイブリッドスクリーニングなどの技法をそのような同定のために用いることができる。特に有用な技法は示差遺伝子

スクリーニングである。本明細書に記載のクローン化された細胞系は、そのような研究に特に適している。なぜなら、単一の親細胞から由来したものであるので、それ故に非クローン化細胞系と比較すると、ヒト中脳神経前駆細胞に特異的な遺伝子が増幅される。実験的操作(例えば、アポトーシスの誘導)の際に発現される新規の遺伝子およびタンパク質も同定することができる。

【0043】

本明細書で提供される細胞系は*in vitro*での神経細胞死のモデルとして用いることもでき、そのような神経細胞死としては、限定はされないが、増殖因子を取り除くことにより誘導される神経アポトーシスが挙げられる。簡潔に述べれば、クローン化された条件付きで不死化されたヒト中脳神経前駆細胞はアポトーシスの基底レベルが最低限となるようにデザインされた条件下で分化させることができる。適切な条件は、異なる試験条件下で増殖させた細胞中のアポトーシスの状態にある核の比率を評価することによって容易に同定することができる。アポトーシスの状態にある核の比率は一般に、DAPI染色または*in situ*でのニック末端標識アッセイなどの、当業者にはよく知られた方法によって測定することができる。アポトーシスの基底状態を最小限とするための適切な条件としては、 $1\mu\text{g/mL}$ のテトラサイクリン、フォルスコリン($10\mu\text{M}$)、IGF-I(100ng/mL)、CNTF(20ng/mL)、GDNF(20ng/mL)、およびBDNF(20ng/mL)の存在下での分化が挙げられる。細胞は分化を起こすのに十分な時間、アポトーシスの基底状態(通常は分化の最初の10日間に増加する)を最小限のものとしつつ、適切な分化条件で維持しなければならない。

【0044】

次いで、そのような分化した神経細胞をアポトーシスの数種あるモデルのいずれかに用いることができる。そのような1モデルにおいては、濃縮された核を有するアポトーシスの状態にある細胞の比率を有意に増加させるために十分な時間、増殖因子とN2サプリメントを取り除いておく。そのようなアポトーシスの状態にある細胞の比率が少なくとも約2倍に増加することが好ましい。上述の代表的な条件下では、約18時間の除去で通常は十分である。除去してから48時間後に著しい比率の細胞が死に至るはずである。増殖因子の除去後に少なくとも約50%の

ニューロンが生存していないことが好ましい。

【0045】

そのような特定のモデルに限らず、アポトーシスの機構の研究、ならびに神経細胞のアポトーシスに対する種々の条件および薬剤の影響を研究するために、当業者にはよく知られた実験技法を用いて、それらの細胞を用いることができる。例えば、神経細胞死に影響を及ぼす薬剤のスクリーニングのためにそれらの細胞を用いることができる。そのようなスクリーニングは、細胞を増殖因子除去期間中に候補薬剤と接触させ、次いでその候補薬剤のその後のアポトーシスのレベルに影響を与える能力を評価することによって行うことができる。同様に、その細胞は神経細胞死を調節するタンパク質をスクリーニングするために用いることができる。そのようなスクリーニングにおいては、候補タンパク質(例えば、酵素)の発現または活性のレベルを標準的な技法を用いて細胞内で変化させ、次いで処置(限定はされないが、増殖因子の除去が挙げられる)後のアポトーシスのレベルの変化に与える影響を測定する。

【0046】

下記の実施例は説明のために提示するものであり、限定しようとするものではない。

【0047】

実施例

ヒト中脳前駆細胞系の調製

この実施例はヒト中脳神経前駆細胞の条件付きでの不死化を説明するものである。

【0048】

1次培養中のヒト中脳細胞は最初の3か月のヒト胎児脳から調製した(Advanced Bioscience Resources, Inc.から入手)。その組織は州および連邦の法律および規則に準拠して調達したものである。中脳をプロテアーゼ23(3mg/mL)を含有する酵素溶液中で37℃で30~45分間、時々つき砕きつつインキュベートして解離させた。分散させた中脳細胞を、トリプシンインヒビター(1mg/mL)およびウシ血清アルブミン(1mg/mL)を含有する塩水で洗った。その後、細胞を約 3×10^4 個/cm² の

密度で、DMEM/F-12、10%ウシ胎児血清、およびFGF-2(ヒト遺伝子組換え、40ng/mL、Boehringer Mannheim, Indianapolis, 米国インディアナ州)からなる増殖培地にプレートした。

【0049】

レトロウイルス感染には、LINX v-mycベクターを用いた(Hoshimaruら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1518-1523, 1996; Sahら, Nature Biotechnol. 15:574-580, 1997)。この系においては、テトラサイクリンのない条件では、テトラサイクリン制御トランスアクチベーター(tTA)は ph_{CMV-1} からの転写を強く活性化し、下流のv-myc癌遺伝子の発現をもたらす。テトラサイクリン(0.01~1.0 μ g/mL)はtTAによる転写活性化をほぼ完全に抑え、そのことによってv-myc癌遺伝子の転写をブロックする。そのベクター中にはネオマイシン耐性を付与する遺伝子も存在している。中脳細胞培養物には、Sahら, Nature Biotechnol. 15:574-580, 1997に記載の方法と類似の方法を用いてレトロウイルスを感染させG418で選択した。

【0050】

G418での選択後、培養物を、N2サプリメント、FGF-2(40ng/mL)、EGF(40ng/mL)およびPDGF A/B(20ng/mL)を含んだDMEM/F-12からなる単純化した増殖培地中で維持した。コンフルエンスに近くなった培養物にトリプシン処理を行い1:5に分割した。典型的には、ほぼコンフルエンスなT75フラスコ1個から 10^7 個の細胞が得られ、培養物は3~7日毎に継代した。

【0051】

G418での選択の間、ある程度の細胞死が生じた；選択後、v-myc⁺細胞はその培養物中で優勢な細胞となった。これらのG-418耐性、v-myc⁺細胞は付着性の単層として増殖した。細胞の大部分は非常に短い突起(process)を有する多角形であった。

【0052】

テトラサイクリンを用いた細胞系の分化によって、神経の分化の増加(図1)ならびにv-myc癌タンパク質発現の抑制(図2A-2D)がもたらされた。TH発現の増加もいくつかの細胞系では認められ、このことはドーパミン作動性ニューロンの存在

を示している。

【0053】

クローン化した細胞系は96ウェルのプレート中での限界希釈によって単離した。単一のコロニーを上述のとおり栄養を与え継代することによって増殖させた。増殖させた18の培養物のうちで14個は単一の細胞から由来したものと考えられる。

【0054】

1つのクローン(MESII(1)-C2)を、N2サプリメント、テトラサイクリン($1\mu\text{g/mL}$)、フォルスコリン($10\mu\text{M}$)、GDNF(20ng/mL)、およびBDNF(20ng/mL)を含むDMEM/F-12中で分化させた。分化させた後には、多量のMAP2abおよびTH免疫応答性細胞が観察された。このような免疫細胞化学的検討のために、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、ブロッキングバッファー中の1次抗体と室温で2時間インキュベートし、濯ぎ、次いでブロッキングバッファー中のフルオレセイン(FITC)またはTexas-redを結合させた種特異的2次抗体(Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, 米国ペンシルベニア州)と室温でさらに1時間インキュベートした。培養物をPBSで3回洗い、代表的な視野の計数および写真撮影の前にPV A/DABCOでカバーガラスをかけた。

【0055】

クローンMESII(1)-C2も上述のとおり分化させたがこの場合にはCNTF(20ng/mL)およびIGF-I(100ng/mL)を添加した。分化した細胞の約11%がMAP2ab免疫応答性で、細胞の5%がTH免疫応答性であった(図3)。これらの分化条件では、MAP2ab陽性細胞の41%がTH陽性でもあり、TH陽性細胞ではその100%がMAP2ab陽性であった。

【0056】

これらの結果は、不死化されたヒト中脳細胞系が分化してドーパミン作動性ニューロンとなることを示している。さらに、その他の不死化されたヒト中脳細胞系は分化してGABA作動性ニューロンとなる(図4)。

【0057】

上述のことから、本明細書に記載した本発明の特定の実施形態は説明の目的のものであるとはいえ、本発明の精神と範囲から逸脱することなく種々の改変を行

いうことは理解されるであろう。従って、本発明は添付の特許請求の範囲によって限定されること以外には限定されないものである。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図1Aおよび1Bは、不死化ヒト中脳細胞の位相差顕微鏡像である。図1Aは増殖条件下で増殖させた後の細胞を示している。図1BはN2サプリメント、フォルスコリン ($10\mu\text{M}$)、BDNF(20ng/mL)、およびGDNF(20ng/mL)を含むDMEM/F12培地で6日間分化させた後の細胞を示している。

【図 2】

図2A~2Dは、位相差顕微鏡像(図2Aおよび図2C)、および写真(図2Bおよび図2D)で、増殖条件での培養後(図2Aおよび図2B)、または6日間分化させた後(図2Cおよび図2D)の不死化ヒト中脳細胞の代表的なものにおけるv-mycに対する標識を示すものである。各フィールドにおいて、位相差顕微鏡像(固定後)は対応する免疫蛍光写真の左側に示してある。

【図 3】

図3は、6日間分化させた後の不死化ヒト中脳細胞系の代表的なものにおける、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)に対する免疫蛍光標識を示す写真である。培養物は、N2サプリメント、テトラサイクリン($1\mu\text{g/mL}$)、フォルスコリン($10\mu\text{M}$)、BDNF(20ng/mL)、GDNF(20ng/mL)、CNTF(20ng/mL)、およびIGF-I(100ng/mL)を含有するDMEM/F12培地で分化させた。

【図 4】

図4は、6日間分化させた後の不死化ヒト中脳細胞系の代表的なものにおける、GABAに対する免疫蛍光標識を示す写真である。培養物は、N2サプリメント、テトラサイクリン($1\mu\text{g/mL}$)、フォルスコリン($10\mu\text{M}$)、BDNF(20ng/mL)、GDNF(20ng/mL)、CNTF(20ng/mL)、およびIGF-I(100ng/mL)を含有するDMEM/F12培地で分化させた。

【図1】

増殖型

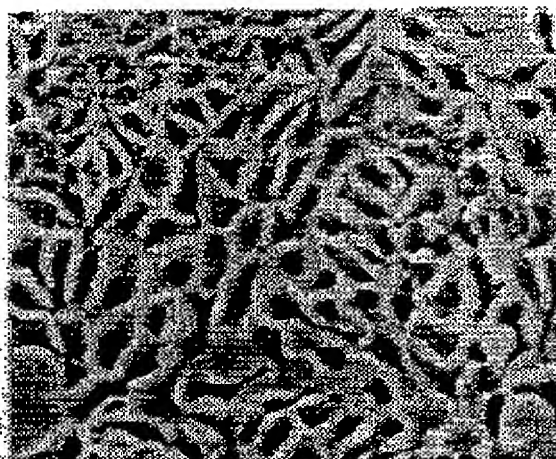


Fig. 1A

分化型

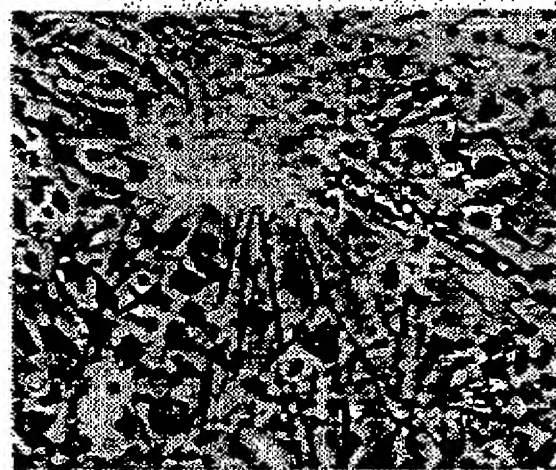
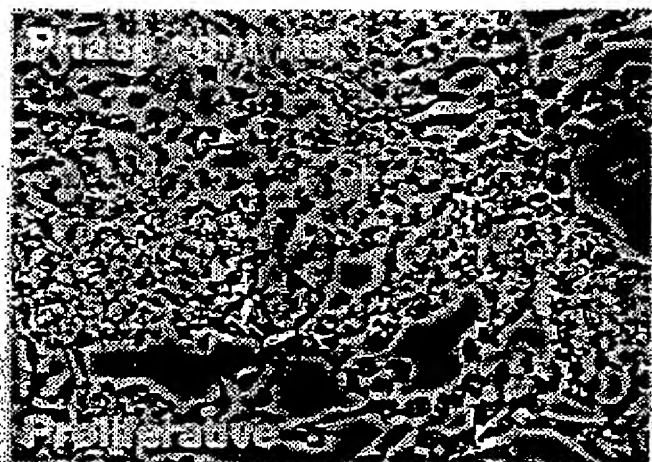
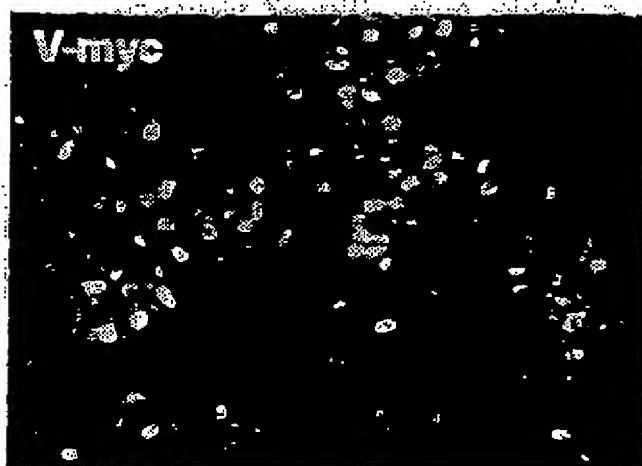
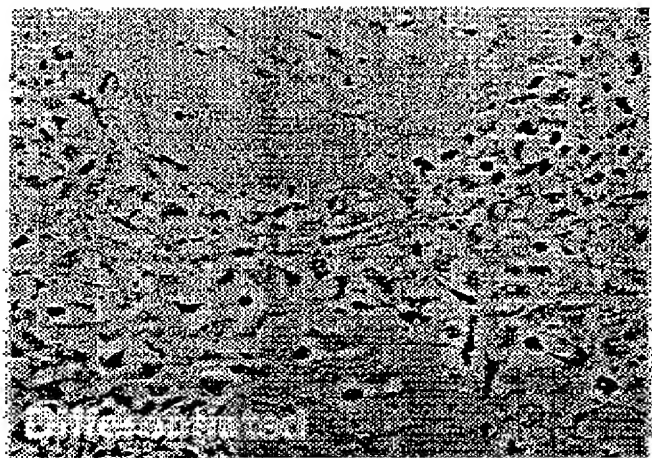


Fig. 1B

【図2A・B】

*Fig. 2A**Fig. 2B*

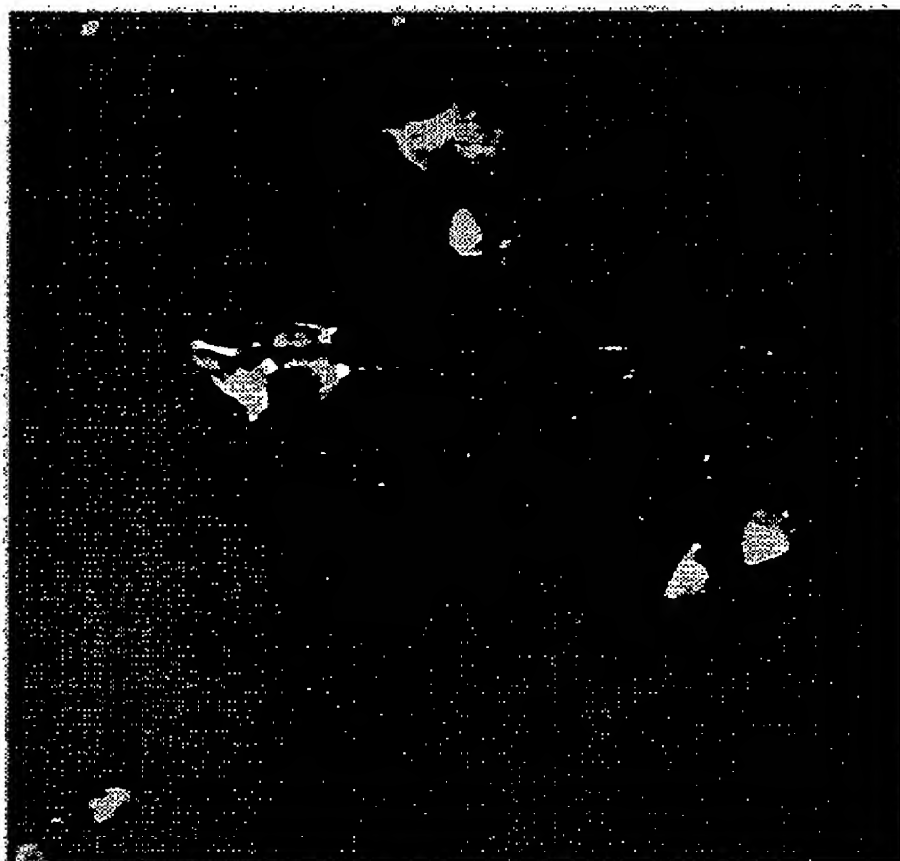
【図2C・D】

*Fig. 2C**Fig. 2D*

【図3】

*Fig. 3*

【図4】

*Fig. 4*

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 99/18403		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N5/10 A61K48/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PRASAD, K.M. ET AL.: "Establishment and characterization of immortalized clonal cell lines from fetal rat mesencephalic tissue" IN VITRO CELL. DEV.BIOL. ANIM., vol. 30A, no. 9, - 1994 pages 596-603, XP002122566 the whole document	6-8
Y	DI PORZIO, U. ET AL.: "Establishment and characterization of a neuronal cell line obtained by c-myc immortalization of mouse mesencephalic cells" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 18, no. 1-2, 1992, page P410 XP002122567 see the abstract	1-24
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 November 1999		Date of mailing of the international search report 03/12/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Alt, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 99/18403

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SAH, D.E.Y.: "Bipotent progenitor cell lines from the human CNS" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 15, no. 6, 1997, pages 574-580, XP002049253 cited in the application the whole document	1-24
Y	WO 98 10058 A (SIGNAL PHARM INC) 12 March 1998 (1998-03-12) the whole document	1-24
Y	HOSHINARU, M. ET AL.: "Differentiation of the immortalized adult neuronal progenitor cell line HC252 into neurons by regulatable suppression of the v-myc oncogene" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 93, no. 4, 1996, pages 1518-1523, XP002033326 cited in the application see Figure 1 the whole document	1-24
A	HARTIKKA, J. ET AL.: "Cyclic AMP, but not basic FGF, increases the in vitro survival of mesencephalic dopaminergic neurons and protects them from MPP(+)-induced degeneration" JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH, vol. 32, 1992, pages 190-201, XP002092604 see page 195, first column, lines 7-12	11,12
A	ZHOU, J. ET AL.: "The response of human and rat fetal ventral mesencephalon in culture to the brain-derived neurotrophic factor treatment" BRAIN RESEARCH, vol. 656, no. 1, 1994, pages 147-156, XP002122571 the whole document	11,12
A	HELLER, A. ET AL.: "Glial-derived neurotrophic factor (GDNF) induced morphological differentiation of an immortalized monoclonal hybrid dopaminergic cell line of mesencephalic neuronal origin" BRAIN RESEARCH, vol. 725, no. 1, 1996, pages 132-136, XP002122572 the whole document	11,12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 99/18403

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9810058 A	12-03-1998	AU 4331597 A EP 0925357 A	26-03-1998 30-06-1999

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/50	P
33/50			Z
C 1 2 N 15/09		(C 1 2 Q 1/04	
(C 1 2 Q 1/04		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 N 5/00	B
		15/00	A
(72)発明者	レイモン, ヘザー, ケー.		
	アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア		
	州, ラ ホヤ, ジェンター ストリート		
	535		
F ターム (参考)	2G045 AA40 BB20 CB01 CB26 CB30		
	DA12 DA13 DA14 DA36 DA77		
	4B024 AA01 AA12 BA21 DA02 EA02		
	GA11 GA18 GA23 HA01 HA12		
	HA17		
	4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ42 QQ52		
	QQ79 QR55 QR69 QR77 QR80		
	QS24 QS28 QS34		
	4B065 AA93X AA93Y AB01 AC10		
	BA02 BA06 BA25 BB13 BB28		
	BB34 BD32 CA24 CA44 CA46		
	4C087 AA01 BB45 BB64 NA14 ZA02		